

**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»**

На правах рукописи

Майкова Евгения Владимировна

**БИОХИМИЧЕСКИЕ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ИЗМЕНЕНИЯ
АКТИВНОСТИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ ПРИ
ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРДЦА**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань – 2012

Работа выполнена на кафедре биохимии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Кравцова Ольга Александровна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор

Чернов Владислав Моисеевич

кандидат медицинских наук, доцент

Хасанов Нияз Рустемович

Ведущая организация:

ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, г. Казань

Защита состоится «16» февраля 2012 года в « 13⁰⁰» часов на заседании Диссертационного совета Д212.081.08 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке имени Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Автореферат разослан “___” января 2012 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Абрамова З.И.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – одно из наиболее распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы, обусловленное атеросклеротическим поражением сосудов, в патогенезе которого большую роль играет сложное взаимодействие наследственных и средовых факторов, что указывает на мультифакторную природу данного заболевания, а выявление наследственной природы и молекулярных механизмов его развития составляет основу современной медицины (Сироткина О.В. и др., 2003; Friedlander Y. et al., 2001; Карпов Ю.А., 2010; Власова Н.В., Асташкина О.Г., 2010; Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я., 2007; Васюк Ю.А., 2007; Чазов Е.И., 2009).

В настоящее время показано, что одним из факторов риска развития ИБС является изменение в работе антиоксидантной системы (АОС), маркерами нарушения которого являются, в первую очередь, продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) и некоторые ферменты, генетический дефект которых ведет к изменению их активности и нарушению антиоксидантной защиты (Закирова А.Н., 2004; Шалаев С.В., 2008; Escola-Gil et al., 2006).

Инициация ПОЛ при ИБС обусловлена снижением активности естественных антиоксидантных ферментов и дефицитом антиоксидантов, а также наличием дислипидемии, при которой содержащиеся в высокой концентрации в крови атерогенные липиды служат легким субстратом для свободно-радикального окисления. Избыток первичных продуктов ПОЛ, к которым относятся гидроперекиси липидов (ГПЛ), запускает системную воспалительную реакцию: происходит усиление агрегации тромбоцитов и адгезии нейтрофилов к эндотелию, нарушение синтеза оксида азота и развитие вазоконстрикции, снижение содержания ненасыщенных жирных кислот, цитотоксическое повреждение эндотелиоцитов (Меньщикова Е.Б. и др., 2008; Голиков А.П. и др., 2003; Ланкин В.З. и др., 2000). По уровню конечных продуктов ПОЛ, в частности малонового диальдегида (МДА), можно судить о неблагоприятных последствиях свободно-радикальных процессов, а именно о степени эндогенной интоксикации в стенке эндотелия (Кишкун А.А., 2010).

Основную антиоксидантную функцию в плазме крови выполняет церулоплазмин, являющийся белком острой фазы воспаления в эндотелии сосудов и, благодаря высокой феррооксидазной активности, предотвращающий неферментативные реакции, дающие начало свободным радикалам и дальнейшему развитию липопероксидации (Ващенко В.И., 2006).

Сложный механизм формирования клинического фенотипа ИБС, в частности, острого инфаркта миокарда (ОИМ) и стабильной стенокардии напряжения (СН), обусловлен также большим количеством и высоким полиморфизмом генетических маркеров, вовлеченных в его патогенез. Последние десятилетия в мире активно

ведутся исследования по выявлению генетических факторов риска развития ИБС на основе полиморфизма ядерных генов, перечень которых включает не менее 300 наименований из различных групп: гены белков липидного обмена, белков, регулирующих сосудистые реакции, гены гемостатических факторов и т.д (Human genetics official database, 2010). Кроме того, последние несколько лет пристальное внимание исследователей обращено к полиморфизму митохондриального генома, поскольку недостаточность функции дыхательной цепи, вызванной индивидуальными особенностями митохондриальной ДНК, может сказываться на различных биохимических функциях организма, в том числе на состоянии системы окислительного фосфорилирования и генерации активных форм кислорода (Тодоров И.Н., 2007; Smeitink J. и др., 2001).

Тем не менее, патогенетические факторы и механизмы дисрегуляции работы АОС при ИБС с различным клиническим течением еще недостаточно исследованы, так как фенотипическое проявление генетического полиморфизма в значительной мере зависит от генофонда и условий жизни конкретной популяции, чем и объясняется противоречивость данных по ассоциации полиморфизма генов-кандидатов с риском развития ИБС.

Таким образом, на сегодняшний день представляется актуальной комплексная оценка вклада биохимических и генетических маркеров в изменение активности антиоксидантной системы при определенных клинических проявлениях ишемической болезни сердца у населения Республики Татарстан (РТ).

В связи с вышесказанным, была поставлена **цель** – характеристика антиоксидантного статуса крови при ишемической болезни сердца и выявление генетических факторов риска развития данной патологии.

В соответствии с целью, были поставлены следующие **задачи**:

1. Выяснить особенности антиоксидантного статуса сыворотки крови (показатели общей антиоксидантной активности, церулоплазмينا, гидроперекисей липидов и малонового диальдегида) у больных ИБС с клиническим проявлением в форме стабильной стенокардии напряжения (СН) и острого инфаркта миокарда (ОИМ).
2. Изучить связь между показателями антиоксидантной системы сыворотки крови при различных клинических формах ИБС.
3. Провести анализ ассоциации полиморфных маркеров ядерного генома: +9T/C гена SOD2, +186C/T гена SOD3, -262C/T гена CAT, +242C/T гена NADPH1, +593C/T гена GPX1, а также полиморфизма митохондриальной ДНК с риском развития ИБС у населения РТ.

4. Показать влияние исследуемых полиморфных маркеров ядерного и митохондриального генома на изменение показателей антиоксидантного статуса сыворотки крови при ИБС.

Научная новизна

Дана сравнительная характеристика изменения общей антиоксидантной активности сыворотки крови, содержания церулоплазмينا, первичных и конечных продуктов ПОЛ (гидроперекисей липидов и малонового диальдегида) при остром инфаркте миокарда (ОИМ) и стабильной стенокардии напряжения (СН) в зависимости от гендерной принадлежности и генетических особенностей пациентов.

Впервые охарактеризована вариабельность митохондриальной ДНК при ИБС у населения РТ. Показано, что одна из наиболее распространенных европеоидных гаплогрупп мтДНК маркирует повышенную предрасположенность к развитию стабильной стенокардии напряжения у населения РТ.

Исследован вклад 5 полиморфных локусов генов, кодирующих ферменты про- и антиоксидантной системы, в формирование генетической предрасположенности к ОИМ и СН у населения РТ.

Впервые проведен комплексный анализ по выявлению биохимических и генетических маркеров изменения активности антиоксидантного статуса сыворотки крови при ОИМ и СН.

Научно-практическая значимость работы

Данные полученные в результате исследования, могут служить основой для формирования групп повышенного риска развития ИБС и разработки дифференцированных программ профилактики заболевания у конкретного человека с учетом данных генотипирования.

Материалы исследования представляют интерес в области биохимии, генетики популяций, клинической диагностики и могут быть использованы в учебном процессе на биологических и медицинских факультетах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Изменение антиоксидантного статуса сыворотки крови при ишемической болезни сердца зависит от ее клинического проявления, гендерной принадлежности пациентов и полиморфизма генов антиоксидантной системы.
2. Полиморфные варианты генов SOD2 и GPX1 являются факторами риска развития острого инфаркта миокарда, полиморфизмы генов CAT, SOD3 и митохондриального генома маркируют повышенный риск развития стабильной стенокардии напряжения у населения РТ.

Апробация работы

Основные результаты исследований докладывались на итоговой научно – образовательной конференции студентов Казанского государственного университета (Казань, 2006 г.); IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008 г.); 13 annual Symposium for Biology Students of Europe (Казань, 2009 г.); научно-практической конференции «Становление и достижения биохимической школы Казанского университета» (памяти В.Г. Винтера) (Казань, 2009 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов» (Санкт-Петербург, 2010 г.); VI международной научно-практической конференции «Спецпроект: анализ научных достижений» (Днепропетровск, 2011 г.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, среди которых 1 публикация в ведущем рецензируемом издании, рекомендованном в действующем перечне ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 146 страницах текста и включает 27 рисунков и 17 таблиц. Состоит из введения, 4 глав, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 210 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом для исследования служили образцы сывороток венозной крови и препараты ДНК, выделенные из лейкоцитов венозной крови стандартным фенол-хлороформным методом (Маниатис Т., 1984). Определение антиоксидантного статуса сыворотки крови проведено у 128 пациентов с диагнозом ИБС в форме ОИМ и СН (110 и 18 человек соответственно). Генотипирование полиморфных локусов ядерного и митохондриального генома проведено у 266 больных (141 мужчин, 125 женщин) и 165 условно здоровых доноров (81 мужчин, 84 женщины).

Все исследованные группы были сформированы на базе ГУ МКДЦ и БСМП №1 (г. Казань). Диагноз ишемической болезни сердца устанавливался на основании клинических, инструментальных и биохимических данных. Обращалось внимание на типичность клинических показателей, анамнестические данные (перенесенный инфаркт миокарда и наличие диагноза стабильной стенокардии напряжения в анамнезе), специфичность изменений электрокардиограммы. Больные с хронической

сердечной недостаточностью III-IV функционального класса, сложными нарушениями ритма сердца, тяжелыми заболеваниями печени, почек, легких, крови, сахарным диабетом, требующими коррекции, в исследование не включались. В исследование не включались пациенты с активными воспалительными процессами, онкологическими и иммунопатологическими заболеваниями. Исследуемые группы сформированы с учетом пола, возраста, отягощенной наследственности по ИБС (наличие ИБС у кровных родственников). Как больные ИБС, так и лица, составившие группу контроля, представляли собой смешанную популяцию Республики Татарстан и не состояли друг с другом в кровном родстве. Все лица дали информированное согласие на участие в исследовании.

Популяционные исследования вариабельности мтДНК проведены у 939 человек, представляющих дисперсную выборку современного населения РТ. Материал для популяционных исследований собран в ходе экспедиционных выездов в 2004-2007 гг.

Определение антиоксидантного статуса сыворотки крови проводили по показателям суммарной антиоксидантной активности (АОА) и концентрации церулоплазмينا (ЦП), а также активности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) по уровню гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА) в осадке липопротеидов сыворотки крови на базе ЦНИЛ КГМУ (г.Казань) (заведующий к.м.н. С.Р. Абдулхаков). Регистрацию продуктов проводили спектрофотометрическим методом согласно общепринятым методикам (Азнабаева Ю.Г., 2001; Гаврилов, 1983, 1987; Тен Э.В., 1981).

Генотипирование полиморфных локусов митохондриального и ядерного геномов проводили методом ПЦР и ПДРФ-анализа с использованием праймеров, предложенных в работах (Mitrinen K., 2001; Ahn J., 2006; Tiwari A.K., 2009; Izagirre N., 1999; Kolman C., 2000; Quintans B., 2004) на амплификаторах «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», г. Москва) и «MyCycler» (Bio-Rad Laboratories, США).

Продукты амплификации и рестрикции анализировали электрофорезом в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей визуализацией бромистым этидием с использованием гель-документирующей системы ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad Laboratories, США).

Статистический анализ. Для сравнения данных применяли дисперсионный анализ, используя критерии Манна-Уитни и Крускала-Уоллиса с поправкой Бонферрони (Акберова Н.И., 2004). Взаимосвязь между параметрами оценивали с помощью коэффициента корреляции Спирмена (Лакин Г.Ф., 1990). Статистическая обработка выполнена с помощью пакета программ «Excel Office 2003».

Статистическая обработка данных по генотипированию проводилась с помощью программы UNPHASED версии 3.1.5 (программа находится в режиме

свободного доступа (<http://homepages.lshtm.ac.uk/frankdudbridge/software/unphased/>), разработана Frank Dudbridge, 2006, MRC Biostatistics Unit Robinson Way Cambridge CB2 0SR, UK).

Значимость различий между группами по частотам встречаемости аллелей и генотипов исследованных полиморфизмов оценивали по критерию χ^2 при уровне значимости $p=0,05$. Для оценки связи полиморфных локусов в развитии ИБС рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95% доверительных интервалов для ОШ (ДИ_{ОШ}). Из полученных данных по биохимическим показателям в группах больных и группе контроля для объективной оценки вычисляли среднее значение (М) и стандартную ошибку (SE).

Результаты собственных исследований и их обсуждение

Характеристика антиоксидантного статуса при различных клинических проявлениях ишемической болезни сердца

В настоящее время показана взаимосвязь между нарушениями работы системы антиоксидантной защиты организма и генезом сердечно-сосудистых патологий. При этом наибольший интерес вызывают специфические показатели работы АОС, такие как продукты перекисного окисления липидов (малоновый диальдегид и гидроперекиси липидов) и активность антиоксидантных агентов (показатель суммарной антиоксидантной активности, содержание церулоплазмينا в сыворотке крови и ферменты АОС) (Дайбанырова Л.В., 2006; Неверов И.В., 2002).

В связи с этим, нами охарактеризован процесс изменения активности антиоксидантной системы сыворотки крови при различном клиническом течении ИБС (в форме острого ИМ и стабильной СН) на основании количественной оценки четырех специфических маркеров: гидроперекисей липидов (ГПЛ), малонового диальдегида (МДА), церулоплазмينا (ЦП) и суммарной антиоксидантной активности (АОА).

В ходе оценки антиоксидантного статуса сыворотки крови больных ИБС выявлено резкое увеличение средних показателей ЦП ($62,75 \pm 0,81$ мг%) и ГПЛ ($9,33 \pm 0,32$ отн.ед) по сравнению с нормой ($25 \div 48$ мг% и $2 \div 2,3$ отн.ед., соответственно), а также незначительное повышение показателя АОА ($49,20 \pm 2,08$ %, норма $41,5 \div 44,5$ %), при этом, содержание МДА было в пределах нормальных значений ($3,09 \pm 0,22$ мкМ/л, норма $2,2 \div 4,8$ мкМ/л). Показатели АОС в норме приведены согласно (Кишкун А.А., 2010; Александровский А.А., 2000; Клебанов Г.И., 1999; Березин Т.Т., 1998).

Необходимо отметить, что значительное снижение показателя АОА по сравнению с нормой наблюдалось у 35% больных ИБС, тогда как достоверное увеличение данного показателя отмечено у 65% пациентов (рис. 1). Кроме того,

практически у всех больных ИБС отмечалось увеличение показателей ЦП и ГПЛ (91% и 99%, соответственно). В тоже время, содержание МДА у 35% пациентов находилось в пределах нормальных значений, примерно половина больных характеризовалась снижением данного показателя (48%), у остальных пациентов наблюдалось значительное повышение МДА по сравнению с нормальными значениями.

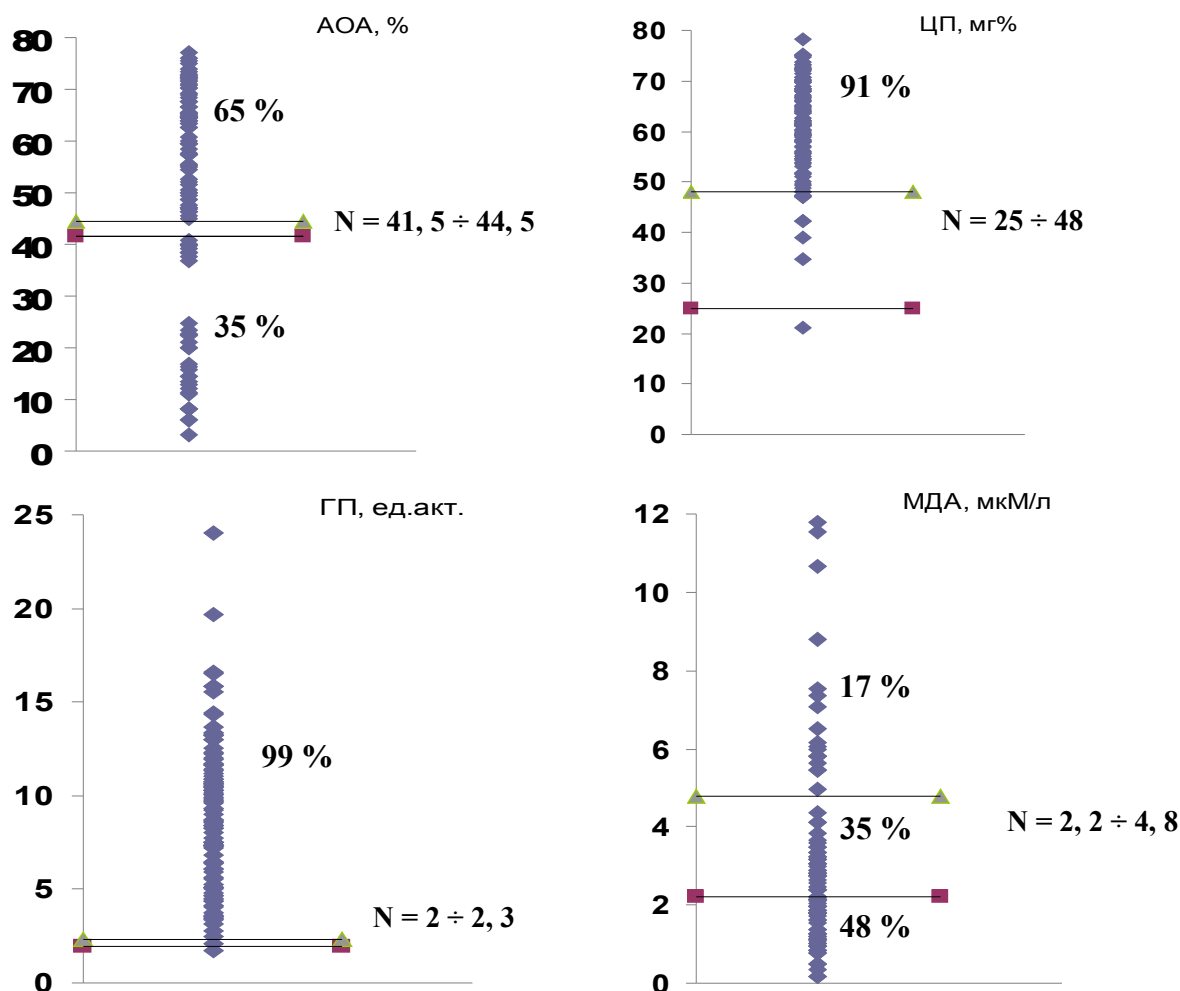


Рис. 1. Распределение пациентов в зависимости от показателей АОС в общей группе больных ИБС.

При разделении исследуемой группы больных ИБС по форме клинического течения заболевания также отмечено преобладание пациентов с повышенными значениями ЦП и ГПЛ (более 90%) как у пациентов с ОИМ, так и со СН, при этом средние значения данных показателей значимо не отличались (табл. 1).

При разделении исследуемых групп по гендерному признаку, в группе больных со СН значительное увеличение показателей ЦП наблюдалось в 100% случаев у женщин, тогда как доля мужчин с повышенными показателями ЦП составила 80%, однако такое распределение не носит статистически достоверного характера ($p > 0,05$). Стоит отметить, что средние значения данного показателя у мужчин со СН

достоверно превышали таковые по сравнению с женщинами из группы больных СН и мужчин с ОИМ ($p < 0,05$).

Отсутствие гендерных различий показано для содержания в сыворотке крови первичного продукта ПОЛ – гидроперекисей липидов: и мужчины, и женщины как группы ОИМ, так и СН, характеризовались значительным увеличением ГПЛ (табл. 1).

Увеличение доли пациентов, характеризующихся статистически значимым повышением показателя АОА, показано в группе с ОИМ (68 %), при этом в группе больных с диагнозом СН доля таких пациентов достоверно снижена (44%) ($p < 0,05$). Более 80% мужчин с диагнозом ОИМ характеризуются значительным повышением АОА, что носит достоверный, по сравнению с женщинами, характер (85% и 52%, соответственно; $p = 0,0008$). В тоже же время, примерно в половине случаев ОИМ у женщин показатели АОА сыворотки снижены, что значительно превышает долю таких пациентов среди мужчин, при этом у мужчин с ОИМ снижение данного параметра более выражено, по сравнению с женщинами (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что нарушение АОС у женщин при ОИМ менее выражено, чем у мужчин, что может быть связано с усилением свободнорадикальных процессов и возникновением очагов некроза тканей при остром инфаркте миокарда и протекании процессов липопероксидации у мужчин по более тяжелому сценарию.

Выявленное нами значимое снижение уровня МДА в общей группе больных наблюдалось примерно в половине индивидуальных случаев у пациентов с диагнозом ОИМ и СН. У трети больных как ОИМ, так и СН значения данного показателя находились в пределах нормы, а у остальных больных отмечено достоверное увеличение среднего уровня МДА, при этом в группе ОИМ данный показатель повышен почти в 1,5 раза по сравнению с группой больных СН ($p < 0,05$).

Полученные в ходе настоящих исследований данные по основным показателям АОС сыворотки крови для больных с диагнозом ИБС противоречат данным других исследований, показывающим сниженную активность антиоксидантных агентов, в частности суммарной АОА и содержания ЦП в сыворотке крови больных ИБС (Дзугкоев С.Г., 2002; Дайбанырова Л.В., 2006, Неверов И.В., 2002).

Необходимо отметить, что значительное повышение содержания ЦП и ГПЛ на фоне сниженных и нормальных значений МДА может свидетельствовать о хронизации нарушения процессов антиоксидантной защиты у больных ИБС. Можно предположить, что при этом образование первичных продуктов ПОЛ компенсируется повышением выработки ЦП и окисление макромолекул не доходит до конечных продуктов реакций, одним из которых является МДА, что особенно выражено у пациентов со стабильной стенокардией напряжения.

Таблица 1. Характеристика показателей АОС сыворотки крови больных с различными клиническими формами течения ИБС в зависимости от гендерной принадлежности

Исследуемые группы		% наблюдения											
		Средние показатели ± стандартная ошибка											
		АОА, %			ЦП, мг%			ГПЛ, отн. ед.			МДА, мкМ/л		
		< N*	N	> N	< N	N	> N	< N	N	> N	< N	N	> N
ОИМ		32%	-	68%	1%	7%	92%	0,5%	0,5%	99%	47%	34%	19%
		21,53±2,18		61,56±1,08	21,09±2,15	43,36±1,66	63,21±0,82	1,72±0,05	2,1±0,12	9,04±0,37	1,38±0,31	3,15±1,13	7,8±1,56
СН		56%	-	44%	-	6%	94%	-	-	100%	50%	42%	8%
		20,88±2,56		63,35±3,01		47,16±2,05	61,47±1,35			9,05±0,84	1,23±0,12	2,39±1,1	5,38±0,72
ОИМ	Муж	15%**	-	85%	-	5%	95%	-	-	100 %	43%	40%	17%
		14,8±2,26		63,02±1,37		45,47±1,65	62,28±0,27			9,44±0,52	1,47±0,12	3,1±0,11	7,35±0,54
	Жен	48%	-	52%	2%	9%	89%	0,5%	0,5%	99%	52%	27%	21%
		25,23±2,62		59,81±1,86	21,09±2,15	42,09±2,42	64,25±1,42	1,72±0,05	2,1±0,12	8,73±0,53	1,32±0,1	2,9±0,11	7,05±0,72
СН	Муж	55%	-	45%	-	20%	80%	-	-	100%	53%	47%	-
		21,47±2,89		63,6±5,37		47,16±2,05	65,65±2,56			9,03±1,13	1,45±0,13	3,59±0,09	
	Жен	69%	-	31%	-	-	100%	-	-	100%	54%	38%	8%
		24,18±2,27		65,47±2,07		-	60,17±2,44			9,05±0,88	1,26±0,66	3,21±0,56	5,38±0,72

* - < N, N, > N – отдельные показатели АОС ниже нормы, в норме и выше нормы, соответственно.

** - Жирным шрифтом выделены статистически значимые различия (p<0,05).

Оценка взаимосвязи между показателями активности антиоксидантной системы крови при различных клинических проявлениях ишемической болезни сердца

Данных о взаимовлиянии продуктов ПОЛ и показателей активности антиоксидантных агентов и их комплексной диагностической значимости, особенно при различных клинических вариантах течения ИБС, недостаточно. В связи с этим, нами проведен анализ корреляционной зависимости между уровнем продуктов ПОЛ и показателями ЦП и АОА в сыворотке крови у больных с различными клиническими формами течения ИБС.

В ходе нашего исследования показано, что между содержанием ГПЛ и ЦП существует прямая корреляционная зависимость средней степени, при этом она более выражена для пациентов с диагнозом стабильная стенокардия напряжения ($R_s=0,41$, $p<0,05$) (рис.2). Кроме того, прямая корреляционная зависимость показана между показателями МДА и ЦП в обеих группах, наиболее выраженная у пациентов с диагнозом ОИМ ($R_s=0,39$, $p<0,05$).

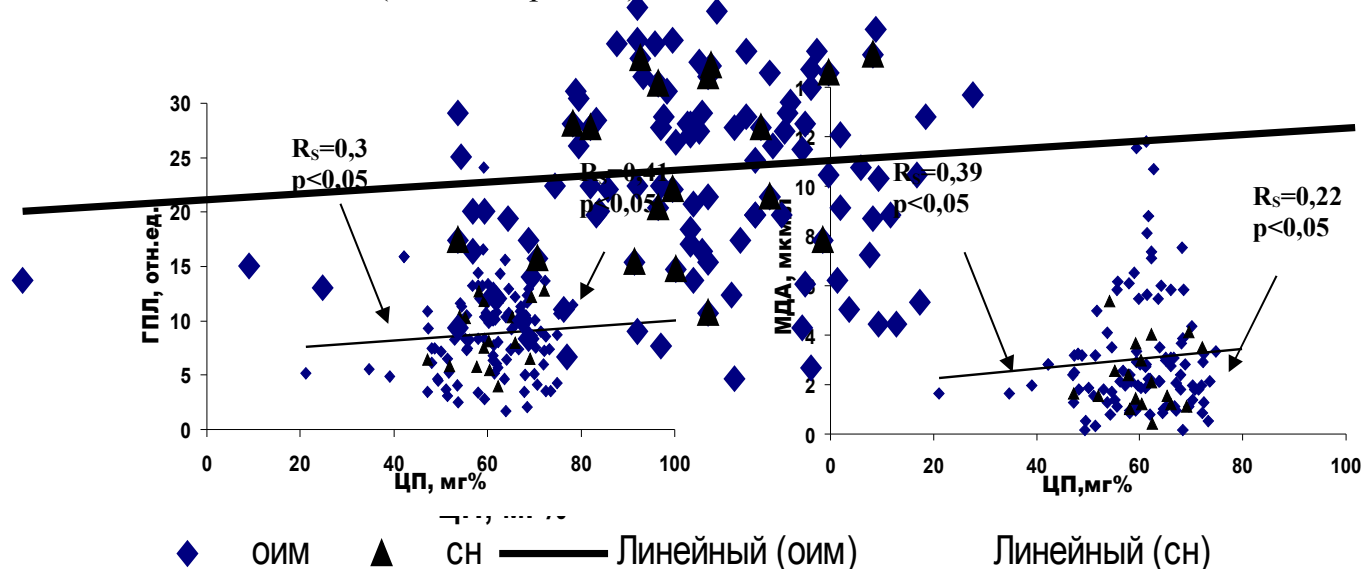


Рис.2. Корреляционный анализ между уровнем содержания основных показателей работы АОС (МДА, ГПЛ, суммарная АОА и ЦП) при различных клинических проявлениях ИБС: стенокардия напряжения (СН) и острый инфаркт миокарда (ОИМ).

Полученные результаты не согласуются с данными немногочисленных исследований, поскольку в работах некоторых авторов показана слабая обратная корреляционная взаимосвязь при ИБС между активностью ЦП и уровнем ГПЛ, а между концентрацией ЦП и содержанием вторичных продуктов ПОЛ выявлена значимая отрицательная зависимость (Ключкова Г.Р., 2011).

Обнаруженная в данном исследовании прямая корреляционная зависимость между содержанием продуктов ПОЛ и ЦП также может свидетельствовать о «перегрузке» системы антиоксидантной защиты: в ответ на увеличение содержания

продуктов перекисного окисления липидов в воспаленном сосудистом эндотелии идет возрастание антиоксидантного статуса и повышение выработки церулоплазмينا с хронизацией данных процессов, особенно при стабильной СН, тогда как при ОИМ усиливается процесс липопероксидации, что приводит к увеличению содержания конечных продуктов ПОЛ, несмотря на повышенную выработку антиоксидантов.

Генетические факторы риска развития ишемической болезни сердца

Вариабельность митохондриального генома

Традиционно митохондрии рассматривались как энергетические центры клетки, производящие основную массу АТФ. Многие исследования, проведенные на этих органеллах, фокусировались на объяснении молекулярных событий, связанных с синтезом АТФ путем окислительного фосфорилирования, и на изучении биогенеза механизмов этого сложного процесса (Тодоров И.Н., 2007). Тем не менее, в последние годы показано, что митохондрии вовлечены также в ряд других процессов, связанных с различными патологическими состояниями организма. В частности, митохондриальная цепь электронного транспорта, которая контролируется генами митохондриальной ДНК (мтДНК), является мощным источником активных форм кислорода и может участвовать в развитии окислительного стресса при эндотелиальной дисфункции (Guzik T.J. et al, 2006).

В популяциях человека накоплено большое количество однонуклеотидных замен в последовательности мтДНК, которые в особых комбинациях представляют так называемые митохондриальные гаплогруппы (Mueller E.E. et al., 2009; Torroni A., 1994). Хотя многие исследователи полагают, что полиморфизмы мтДНК, характеризующие гаплогруппы, являются нейтральными, и возможно их использование только как маркеров в популяционных исследованиях, экспериментальные данные последних лет показывают, что носительство определенной гаплогруппы может оказывать различное влияние на активность компонентов дыхательной цепи и развитие патологических процессов при различных заболеваниях (Tanaka M. et al., 2002; Guo L.J. et al., 2005; Fuku N. et al., 2002; Rosa A. et al., 2008; Kofler B. et al., 2009; Benn M. et al., 2008).

В ходе проведенных нами популяционных исследований разнообразия мтДНК населения РТ показано преобладание европеоидного компонента (около 80%) (гаплогруппы H, J, U и W, характеризующиеся точечными заменами в генах компонентов дыхательной цепи), при этом монголоидные гаплогруппы (около 20%) представлены в основном 2 митотипами - A и D.

Сравнительный анализ распределения основных гаплогрупп мтДНК в группе больных ИБС и условно здоровых лиц также выявил преобладание европеоидных гаплогрупп. Распределение основных гаплогрупп мтДНК в исследуемых группах

больных и группе контроля согласуется с данными популяционных исследований в РТ (рис. 3).

Сравнительный анализ распределения частот гаплогрупп мтДНК в контрольной группе и исследуемых группах больных с диагнозом ИБС, показал достоверное увеличение частоты встречаемости гаплогруппы Н в группе с диагнозом СН по сравнению с группой контроля (ОШ=1,89, ДИ 0,069-0,1, $p<0,05$). Гаплогруппа Н характеризуется заменой аденина на гуанин в положении 7028 гена CO1, который кодирует полипептид цитохромоксидазу c1, основной компонент комплекса IV митохондриальной дыхательной цепи (Finnila S., 2000; Macaulay V. et al., 1999). Изменение активности данного комплекса нарушает работу дыхательной цепи, уменьшает градиент митохондриального проточного потенциала и препятствует синтезу АТФ в митохондриях, тем самым нарушая образование активных форм кислорода, повреждающих мембраны клеток (Тодоров И.Н., 2007; James A.M., Murphy M.P., 2002).

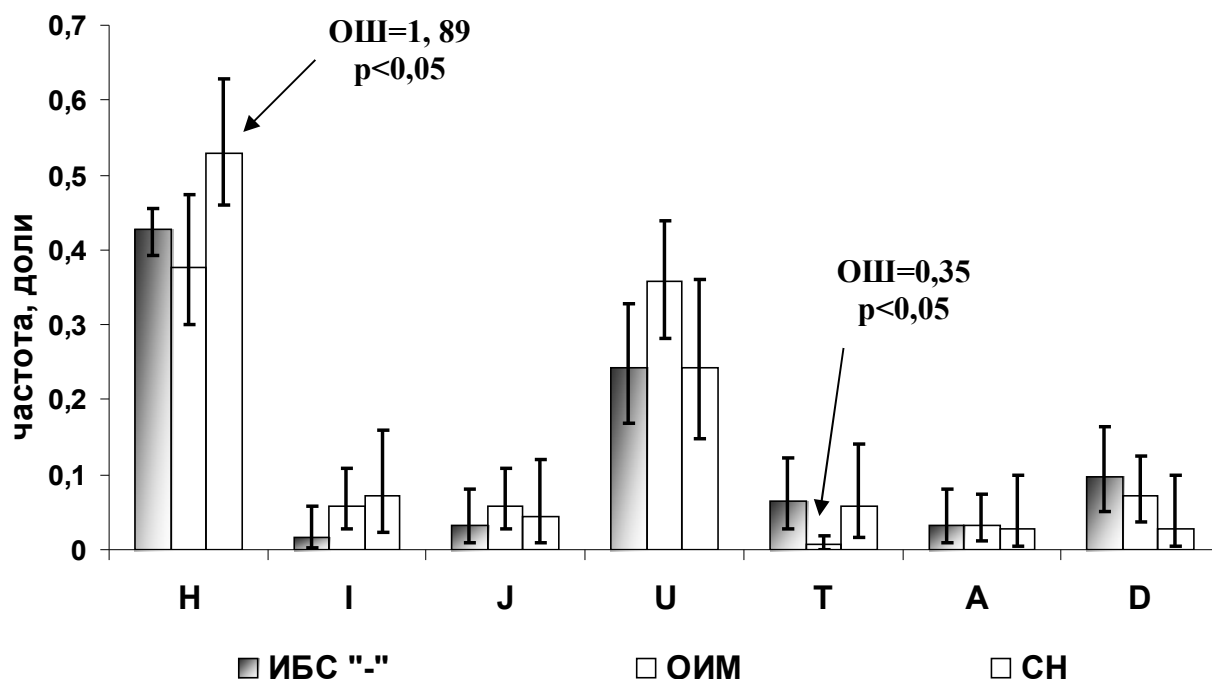


Рис. 3. Распределение частот встречаемости основных гаплогрупп мтДНК в исследуемых клинических группах больных (ОИМ и СН) и контрольной группе (ИБС "-").

Кроме того, показано статистически достоверное увеличение частоты встречаемости гаплогруппы Т в группе условно здоровых лиц по сравнению с группой пациентов с диагнозом ОИМ (ОШ=0,35, ДИ 0,036-0,058, $p<0,05$). Необходимо отметить, что гаплогруппа Т характеризуется полиморфизмом 15606 С/Т гена CYTB, продуктом которого является цитохром b (Crawford M., 2007; Finnila S., Majamaa, 2001). Особенности работы дыхательной цепи митохондрий при носительстве гаплогруппы Т могут опосредовано влиять на уровень активных форм

кислорода, снижая тем самым риск развития окислительного стресса в условиях ишемии.

При разделении групп по гендерному признаку, различия в распределении частот встречаемости гаплогрупп не достигали статистической достоверности ($p>0,05$). Однако можно отметить, что в группе больных с диагнозом ОИМ носителями гаплогруппы Т являются только мужчины.

Так как известно, что мтДНК непосредственно участвует в углеводном и липидном обмене и митохондриальная цепь электронного транспорта является мощным источником активных форм кислорода, которые могут окислять биомолекулы с образованием продуктов перекисного окисления, представляло интерес оценить влияние генетического полиморфизма мтДНК на уровень основных показателей работы антиоксидантной системы. (Климов А.Н., 1999; Тодоров И.Н., 2007). При этом были выбраны наиболее часто встречающиеся в исследуемых выборках гаплогруппы мтДНК (табл. 2).

Таблица 2. Средние показатели АОС в группах больных ОИМ и СН в зависимости от гаплогруппы мтДНК

Гаплогруппа	Среднее значение±стандартная ошибка			
	Суммарная антиоксидантная активность, %		Церулоплазмин, мг%	
	ОИМ	СН	ОИМ	СН
H	53,32±3,87	48,01±9,66	63,43±1,18	62,77±0,99
U	51,12±3,02	53,88±10,52	61,25±1,26	60,33±4,23
I	44,98±8,76	31,66±7,94	61,55±5,85	58,14±4,06
J	59,79±3,55	77,13	61,09±3,28	69,48
W	61,97±4,52	0	58,06±1,27	0
A	64,76±5,22	34,77	61,46±5,09	59,15
D	41,85±9,27	0	59,91±3,51	0
M	14,52*	0	48,74	0
Гидроперекиси липидов, отн. ед.			Малоновый диальдегид, мкМ/л	
	ОИМ	СН	ОИМ	СН
H	63,43±1,18	62,77±0,99	3,49±0,47**	1,57±0,36
U	61,25±1,26	60,33±4,23	3,07±0,43	2,44±0,67
I	61,55±5,85	58,14±4,06	4±0,94	4,7±0,68
J	61,09±3,28	69,48	2,36±0,76	4,12
W	58,06±1,27	0	2,73±0,17	0
A	61,46±5,09	59,15	2,15±0,55	1,45
D	59,91±3,51	0	2,52±0,68	0
M	48,74	0	3,16	0

* - только один носитель данной гаплогруппы

** - жирным шрифтом выделены значимые различия в средних значениях ($p<0,05$).

В ходе исследования показано, что носители всех представленных митотипов характеризуются тенденцией к увеличению среднего значения ЦП и ГПЛ в сыворотке крови. Также можно отметить, что только в группе больных СН наблюдается

снижение относительно нормы средних показатели уровня суммарной АОА у носителей гаплогруппы I, которая характеризуется полиморфизмом С8429А в гене АТР8. В свою очередь, АТР8 кодирует 8 субъединицу АТФ-синтетазы, которая является компонентом протонного канала проводимости Комплекса V дыхательной цепи митохондрий (Schon E.A. et al., 2000).

Статистически достоверные различия между группами ОИМ и СН обнаружены только по показателю МДА у носителей гаплогруппы Н. При этом, в группе больных с диагнозом СН среднее значение данного показателя более чем в два раза ниже по сравнению с группой ОИМ, и значительно ниже показателей МДА в норме, что может свидетельствовать о нарушении процесса ПОЛ в сторону постоянного патологического образования первичных продуктов липопероксидации у больных ИБС с клиническим течением в форме стабильной СН.

Таким образом, можно предположить, что накопление мутаций в структурных генах митохондриального генома в процессе длительной эволюции основных западно-европейских популяций, может быть связано с индивидуальными особенностями генофонда отдельной популяции и особенностями изменения функционирования митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, которые ведут к нарушению энергетического метаболизма и выработки свободных радикалов кислорода, а также изменению некоторых показателей перекисного окисления липидов.

Гены ферментов антиоксидантной системы

Антиоксидантная система организма человека условно делится на специфическую и неспецифическую (Меньщикова Е.Б. и др., 2006). Специфическая АОС, основным компонентом которой является ферментативный пул, направлена на разрушение образующихся АФК и продуктов их дальнейших превращений.

Согласно современным представлениям, дисбаланс в работе АОС в основном обусловлен нарушением в работе ферментативного пула антиоксидантной системы, работа которого строго контролируется генетически.

В данной работе проведены ассоциативные исследования по выявлению роли однонуклеотидных замен (SNP) в генах каталазы (CAT, полиморфизм –262С/Т, rs1001179), глутатион-пероксидазы-1 (GPx-1, полиморфизм +593С/Т, rs1050450), митохондриальной супероксиддисмутазы (SOD2, полиморфизм +9Т/С, rs4880), внеклеточной супероксиддисмутазы (SOD3, полиморфизм +186С/Т, rs699473), осуществляющих антиоксидантную защиту организма, а также полиморфизма +242С/Т (rs4673) гена NADPH-оксидазы (NADPH), продукт которого является одним из источников образования активных форм кислорода в клетке, в формировании генетической предрасположенности к определенному клиническому проявлению

ишемической болезни сердца (ОИМ и СН). Все изученные нами полиморфизмы находились в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ($p > 0,05$).

По результатам сравнительного анализа групп больных с различным клиническим течением заболевания и контрольной группы было показано отсутствие ассоциации с риском развития СН/ОИМ полиморфизма +242С/Т гена NADPH1, тогда как остальные исследуемые полиморфные варианты генов ферментов АОС вносят вклад в формирование генетической предрасположенности к ИБС с различными клиническими формами течения у населения РТ (рис. 4).

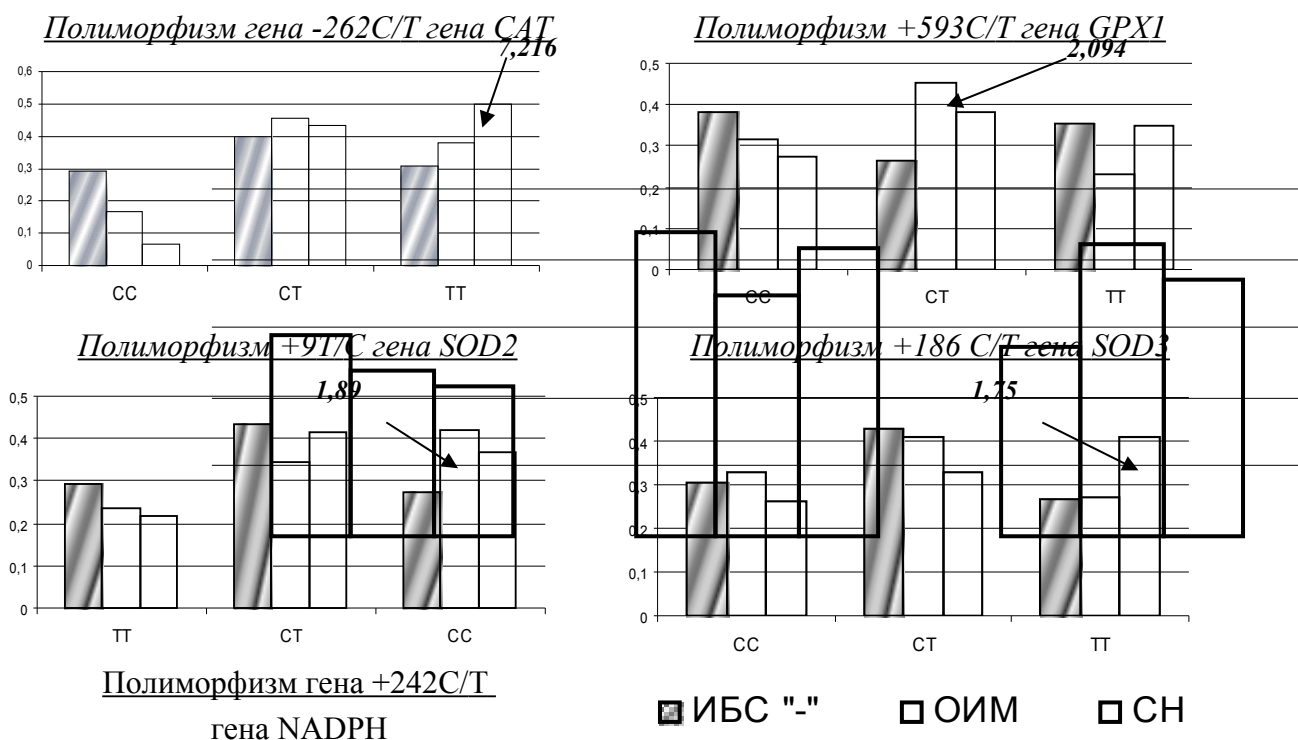


Рис. 4. Распределение частот встречаемости генотипов в группах контроля и ИБС (ОИМ и СН). По оси X – генотипы, по оси Y – частота встречаемости. Цифрами указаны значения ОШ для определенных генотипов.

Ген CAT. Каталаза, являясь важным ферментом тканевого дыхания, разрушает токсичные для клетки перекиси водорода, образующиеся в ходе различных окислительных процессов в организме. Одним из наиболее диагностически значимых полиморфизмов данного гена является однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в положении –262 С/Т промоторной области гена, влияющий на экспрессию гена.

Проведенный анализ распределения частот аллелей и генотипов по полиморфизму гена CAT показал статистически значимое увеличение доли гомозиготного генотипа СС, который оказывает протективное действие в отношении развития ИБС ($ОШ < 1$), тогда как генотип ТТ является маркером повышенного риска,

причем у таких носителей более чем в 7 раз увеличен риск протекания заболевания в форме стабильной стенокардии напряжения (ОШ=7,216, ДИ 2,82-18,43, $p<0,05$), тогда как вероятность развития ОИМ у таких же индивидов увеличена приблизительно в 2 раза (ОШ=2,142, ДИ 1,18-3,85, $p>0,05$). При этом предрасполагающий к стенокардии эффект данного аллеля и генотипа наиболее выражен у женщин (ОШ=6,2; ДИ 1,89-12,18) (табл. 3).

Ген SOD2. Митохондриальная Mn-зависимая супероксиддисмутаза является ключевым антиоксидантным ферментом, который играет важную роль в ограничении окислительного стресса и дисмутирует супероксидные радикалы в перекись водорода, которая далее разлагается цитоплазматической каталазой, вследствие чего образуется вода (Sakar K. et al., 2003). Изученный нами полиморфизм находится во 2 экзоне данного гена и приводит к замене в 16ом положении валина на аланин в аминокислотной последовательности белка.

Нами показано, что доля генотипа CC полиморфного маркера +9T/C гена SOD2 увеличена в группе больных с ОИМ (ОШ=1,899; ДИ 1,09-3,32), при этом предрасполагающий к развитию острого инфаркта миокарда эффект данного генотипа наиболее выражен у мужчин (ОШ=2,26; ДИ 1,03-4,98) (табл. 5). Таким образом, можно предположить, что носительство гомозиготного по аллелю С мутантного генотипа SOD2 может влиять на расположение фермента рядом с внутренней мембраной митохондрий и снижение антиоксидантной активности митохондриальной супероксиддисмутазы (Chan J.M. et al., 2009; Masry T.M. et al., 2005).

Ген SOD3. Цитоплазматическая супероксиддисмутаза является важным защитным ферментом против токсичных радикалов кислорода, которые образуются во внеклеточном пространстве, как в физиологических, так и в патологических условиях (Stralin P., Marklund S.L., 1994). Согласно имеющимся на сегодняшний день клиническим данным, одним из наиболее диагностически значимых полиморфизмов данного гена является +186 C/T во втором экзоне гена, который приводит к замене аргинина на глицин в последовательности аминокислот белка.

Нами показано, что предрасполагающий эффект полиморфных вариантов данного SNP носит четкие гендерные различия (табл. 5). Так, у женщин со стабильной стенокардией напряжения в анамнезе наблюдается достоверное увеличение доли аллеля Т на фоне снижения частоты встречаемости аллеля С ($p=0,003$) и достоверное увеличение доли гомозиготного генотипа ТТ ($p=0,011$). При этом риск развития стенокардии напряжения у женщин, носителей генотипа ТТ, увеличен практически в 4 раза по сравнению с контрольной группой (ОШ=3,6; ДИ 1,38-9,40).

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов по полиморфным маркерам изучаемых генов среди больных с различными клиническими формами ИБС (ОИМ, СН) и лиц группы контроля (ИБС «-»)

Генотип	Мужчины					Женщины				
	p*	ОИМ	ИБС«-»	СН	p**	p*	ОИМ	ИБС«-»	СН	p**
Полиморфизм -262С/Т гена САТ										
СС	0,0194	0,1635	0,3086	0,05405	0,0023	0,1311	0,1714	0,2738	0,07273	0,0034
СТ	0,3652	0,4615	0,3951	0,4595	0,8694	0,6336	0,2738	0,4048	0,4	0,9554
ТТ	0,2624	0,37	0,2963	0,4865	2,982	0,4051	0,3857	0,3214	0,5273	0,0155
Полиморфизм +593С/Т гена GPx-1										
СС	0,3856	0,3204	0,3836	0,2973	0,3716	0,3356	0,3043	0,3797	0,2545	0,129
СТ	0,0081	0,4563	0,2603	0,3514	0,3204	0,0197	0,4493	0,2658	0,4	0,1017
ТТ	0,05268	0,2233	0,3562	0,3513	0,9602	0,154	0,2464	0,3544	0,3455	0,9147
Полиморфизм +9Т/С гена SOD2										
ТТ	0,376	0,25	0,31	0,19	0,176	0,394	0,21	0,27	0,24	0,622
ТС	0,112	0,37	0,48	0,43	0,62	0,311	0,31	0,39	0,4	0,933
СС	0,011	0,39	0,21	0,38	0,054	0,081	0,47	0,33	0,36	0,713
Полиморфизм +186С/Т гена SOD3										
СС	0,28	0,359	0,284	0,405	0,19	0,536	0,275	0,321	0,167	0,043
СТ	0,33	0,35	0,42	0,243	0,065	0,641	0,478	0,441	0,389	0,549
ТТ	0,941	0,291	0,296	0,351	0,55	0,905	0,246	0,238	0,444	0,011
Полиморфизм +242С/Т гена NADPH										
СС	0,3665	0,3684	0,3026	0,3243	0,815	0,2291	0,2712	0,3699	0,3273	0,6174
СТ	0,6479	0,2947	0,2632	0,3784	0,2101	0,1579	0,3898	0,3562	0,3273	0,5135
ТТ	0,1924	0,3368	0,4342	0,2973	0,1613	0,8368	0,339	0,274	0,3455	0,9

p* - данные сравнения группы ОИМ с группой ИБС «-»

p** - данные сравнения группы СН с группой ИБС «-»

Ген GPX1. Изоформа 1ого типа является основным ферментом семейства глутатионпероксидаз, которые катализируют восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды в цитоплазме различных клеток организма. Известно несколько различных полиморфных вариантов данного гена, но наибольший интерес вызывает полиморфизм +593С/Т, локализованный во втором экзоне гена. Показано, что замена пролина на лейцин в положении 197 полипептидной цепи продукта гена приводит к снижению активности фермента в эндотелиальных клетках и макрофагах (Hamanishi T. et al., 2004; Forgione M.A. et al., 2002).

Нами показано значительное увеличение частоты встречаемости гетерозиготного генотипа СТ в группе больных с диагнозом ОИМ по сравнению с контролем вне зависимости от гендерной принадлежности пациентов (ОШ=2,094; ДИ 1,231-3,564). Можно предположить, что носительство гетерозиготного генотипа исследуемого полиморфного локуса гена GPX1 повышает риск развития острого инфаркта миокарда при ишемической болезни сердца как у мужчин, так и у женщин более чем в два раза (ОШ=2,099 и 2,199, соответственно).

Таким образом, полиморфные варианты генов антиоксидантной защиты клетки SOD2 и GPX1 являются факторами риска развития острого инфаркта миокарда, а полиморфизмы генов CAT, SOD3 и митохондриального генома маркируют повышенный риск развития стабильной стенокардии напряжения у населения РТ. Причем прослеживаются четкие гендерные различия по предрасположенности к развитию как ОИМ, так и СН.

Поскольку основные показатели функционирования антиоксидантной системы зависят напрямую от экспрессии генов, кодирующих выработку тех или иных продуктов, нами проведена оценка влияния полиморфизмов исследованных генов на уровень показателей работы АОС в группах больных (табл. 4).

При анализе распределения частот встречаемости генотипов в группах с показателями в норме, ниже и выше нормы, статистически достоверных различий между носителями определенных генотипов в группах больных с диагнозом ОИМ и СН не выявлено ($p>0,05$).

В ходе анализа показано, что носители гомозиготного по аллелю С генотипа (полиморфные локусы генов CAT, GPX и NADPH1) и генотипа ТТ полиморфного варианта гена SOD3 характеризуются достоверно сниженным средним уровнем общей АОА в группе больных с диагнозом СН, по сравнению с нормой по данному показателю и с группой ОИМ, в которой АОА, наоборот, значительно превышает показатели для нормы ($p<0,05$).

Установлено также, что показатели ПОЛ у носителей генотипа СС полиморфного локуса гена САТ достоверно снижены в группе больных со СН по

сравнению с клинической группой ОИМ²⁰, а для генотипов СТ и ТТ полиморфных вариантов генов GPX1 и SOD2, соответственно, аналогичная картина наблюдалась только для показателя МДА в сыворотке крови, при этом средний показатель содержания МДА у таких индивидуумов снижен, по сравнению с носителями других генотипов, почти в два раза (табл. 4).

Таблица 4. Сравнительная характеристика средних показателей АОС сыворотки крови в зависимости от генотипа полиморфизмов генов АОС

Генотип	АОА, %		ЦП, мг%		ГПЛ, отн.ед.		МДА, мкМ/л	
	ОИМ	СН	ОИМ	СН	ОИМ	СН	ОИМ	СН
Полиморфизм -262С/Т гена САТ								
СС	54,03±4,96	16,81±4,57	60,67±3,13	60,55±8,56	7,71±0,66	6,18±0,32	3,09±0,64	1,33±0,22
СТ	44,82±3,39	49,93±7,21	60,84±1,57	59,86±2,43	8,74±0,64	9,68±1,1	2,91±0,37	1,47±0,25
ТТ	51,89±2,98	40,84±8,35	62,57±1,25	61,32±1,99	9,72±0,53	9,18±1,02	3,15±0,34	3,21±0,86
Полиморфизм +593С/Т гена GPx-1								
СС	49,45±3,56	26,96±5,13	59,64±1,66	56,36±3,04	8,77±0,94	7,95±1,18	3,02±0,41	2,18±0,67
СТ	48,75±3,23	55,22±8,74	62,65±1,48	62,69±1,44	8,84±0,53	9,93±1,07	2,96±0,32	2,02±0,52
ТТ	48,92±4,35	41,43±10,49	61,31±2,03	63,02±2,81	9,17±0,58	9,11±1,35	3,24±0,52	2,92±0,42
Полиморфизм +9Т/С гена SOD2								
ТТ	51,44±3,77	49,55±1,46	61,37±1,64	62,03±3,94	8,92±0,62	10,34±2,34	3,05±0,51	1,13±0,08
ТС	47,47±4,67	-	60,43±1,9	-	9,49±0,6	-	3,12±0,43	-
СС	48,82±2,96	42,77±16,82	61,86±1,51	60,85±1,72	8,73±0,61	8,79±0,79	2,98±0,31	2,47±0,37
Полиморфизм +186С/Т гена SOD3								
СС	52,79±4,02	56,91±8,99	60,44±2,15	64,21±1,92	9,71±0,65	9,38±1,16	3,14±0,37	2,2±0,46
СТ	52,25±2,64	45,06±10,69	61,73±1,09	59,41±3,11	9,25±0,58	10,54±1,22	3,27±0,39	2,58±0,92
ТТ	40,61±4,71	27,71±6,01	62,42±2,5	58,25±2,98	7,67±0,69	7,61±1,32	2,37±0,33	2,12±0,46
Полиморфизм +242С/Т гена NADPH								
СС	55,63±3,56	29,16±5,33	61,89±1,6	55,46±2,3	9,49±0,89	8,7±1,28	3,13±0,57	2,68±0,75
СТ	55,55±2,59	-	60,75±1,3	-	8,97±0,63	-	2,98±0,39	-
ТТ	48,56±4,17	45,51±7,17	61,1±2,39	62,7±1,73	7,88	8,91±0,88	3,24±0,43	2,41±0,37

* - жирным шрифтом выделены значимые различия в средних значениях (p<0,05).

Таким образом, можно предположить, что определенные полиморфные варианты генов антиоксидантных ферментов опосредовано связаны с уровнем общей АОА и показателями ПОЛ, причем при развитии стабильной стенокардии напряжении данные показатели значительно снижены, что может свидетельствовать о различном

характере процессов перекисного окисления в крови и эндотелиальных клетках при остром инфаркте миокарда и стабильной стенокардии напряжения.

ВЫВОДЫ

1. Антиоксидантный статус сыворотки крови при ишемической болезни сердца характеризуется достоверным увеличением содержания гидроперекисей липидов (ГПЛ) и церулоплазмينا (ЦП); повышение показателя малонового диальдегида (МДА) может являться интегративным признаком нарушения антиоксидантного статуса вне зависимости от клинической формы течения заболевания (острый инфаркт миокарда и стабильная стенокардия напряжения) и гендерной принадлежности пациентов.

2. Изменение антиоксидантного статуса сыворотки крови у мужчин с диагнозом острый инфаркт миокарда характеризуется повышением показателя суммарной антиоксидантной активности (АОА).

3. Установлена прямая корреляционная зависимость средней степени между показателями церулоплазмينا и продуктами перекисного окисления липидов (ГПЛ и МДА), которая отражает изменение активности антиоксидантного статуса у пациентов с ишемической болезнью сердца в зависимости от ее клинического проявления.

4. Маркерами повышенного риска развития острого инфаркта миокарда является генотип СС полиморфного локуса +9Т/С гена SOD2 у мужчин и генотип СТ полиморфизма +593С/Т гена GPX1 вне зависимости от гендерной принадлежности.

5. Генетическими факторами риска развития стабильной стенокардии напряжения являются гомозиготные по аллелю Т полиморфные локусы -262С/Т гена CAT и +186С/Т гена SOD3 у женщин и гаплогруппа Н митохондриальной ДНК вне зависимости от гендерной принадлежности.

6. Выявлено влияние генетических факторов на показатели антиоксидантного статуса у пациентов со стабильной стенокардией напряжения.

Носители генотипов:

- ТТ и СС полиморфных вариантов генов SOD3 и CAT, соответственно, характеризуются снижением показателя гидроперекисей липидов,
- СС и ТТ полиморфных вариантов генов CAT и SOD2, соответственно, снижением показателя малонового диальдегида,
- СС полиморфизма генов GPX1 и NADPH1 снижением показателя церулоплазмينا,

на фоне достоверного снижения суммарной антиоксидантной активности сыворотки крови у таких пациентов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Конюхова (Майкова), Е.В. Разнообразие митохондриального генофонда в популяции поволжских татар Республики Татарстан / Е.В. Конюхова (Майкова), Фьонг Нга Нгуен, Ф.К. Алимова, О.А. Кравцова // Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки. - 2010. – Т. 152. – № 2. - С. 128 – 135.
2. Майкова, Е.В. Митохондриальная ДНК в предиктивной медицине: роль митохондриального генома в развитии предрасположенности к сердечно-сосудистым заболеваниям / Е.В. Майкова, Фьонг Нга Нгуен, Ф.К. Алимова, А.А. Подольская, О.А. Кравцова // Избранные главы фундаментальной и восстановительной медицины. Учебное пособие. – Казань: КФУ. – 2011.
3. Конюхова (Майкова), Е.В. Полиморфизм главной некодирующей области митохондриальной ДНК у современного населения Республики Татарстан / Е.В. Конюхова (Майкова), А.Н. Аскарлова, О.А. Кравцова // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского государственного университета 2006 г.: сборник статей / ред. Кондратьева И.Г. - Казанский государственный университет - Казань: Издательство Казанского университета, 2006. – С. 8 – 9.
4. Конюхова (Майкова), Е.В. Роль митохондриального генома в развитии мультифакторных заболеваний / Е.В. Конюхова (Майкова), О.А. Кравцова // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. – Новосибирск: издательство "Арта". – 2008. – С. 241.
5. Konjuhova (Maykova), E.V. The diagnostic markers of atherosclerosis and arterial hypertension according to the date of mitochondrial genome / E.V. Konjuhova (Maykova), N. Phuong Nga, O.A. Kravzova / Abstracts of the 13 annual Symposium for Biology Students of Europe. – Kazan. – 2009. – P. 82.
6. Конюхова (Майкова), Е.В. Ассоциация точечных мутаций митохондриального генома с развитием сердечно-сосудистых заболеваний / Е.В. Конюхова (Майкова), Ф.К. Алимова, О.А. Кравцова // Электронный журнал «Структура и динамика молекулярных систем». – Казань. – 2009. – № 6, А. – С. 45 – 48.
7. Конюхова (Майкова), Е.В. Ассоциация полиморфных вариантов генов антиоксидантной системы с риском развития ИБС у населения Республики

Татарстан / Е.В. Конюхова (Майкова), О.А. Кравцова // Бюллетень федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. Тезисы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов» (20-22 мая). Под ред. Шляхто Е.В. – Санкт-Петербург. – 2010.- №2.– С.105 – 106.

8. Майкова, Е.В. [Ассоциация полиморфных вариантов генов супероксиддисмутаза с риском развития ишемической болезни сердца](#) / Е.В. Майкова, Ф.К. Алимова, А.А. Подольская, О.А. Кравцова // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Спецпроект: анализ научных достижений». – Днепропетровск. – 2011. – Т.4. – С. 6 – 9.

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская 18, главное здание КФУ, к.104, отдел аттестации, ученому секретарю Диссертационного совета Д212.081.08 проф. Абрамовой З. И., факс: (843) 238-76-01, e-mail: kazan.gen@gmail.com